

김치로부터 분리한 *Lactobacillus sakei* K-7의 항충치 활성 특성

문진석, 안지은, 한아름, 허정선, 엄현주, 신철수¹, 최혜선², 한남수*

Anticariogenic Activities of *Lactobacillus sakei* K-7 Isolated from Kimchi

Jin Seok Moon, Ji Eun Ahn, A Reum Han, Jeong Seon Heo, Hyun-Ju Eom, Chul-Soo Shin¹, Hye-Sun Choi², and Nam Soo Han*

접수: 2011년 8월 17일 / 게재승인: 2011년 10월 22일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The occurrence of dental caries is mainly associated with oral pathogens, especially cariogenic *Streptococcus mutans*. The aim of this study was to isolate and characterize lactic acid bacterium showing inhibitory activity against cariogenic *Streptococcus mutans*. As results, an isolate with strong inhibitory activity was obtained from Kimchi and it was identified as *Lactobacillus sakei* by API and 16S rRNA gene analyses. This strain secreted an inhibitory compound in cell growth medium and the activity of the compound was completely disappeared by proteinase K revealing the fact that the compound is proteinous substance, bacteriocin. Optimal culture condition for bacteriocin production by *Lb. sakei* K-7 was at pH 7.5 and 37°C for 18 h. Oral administration of this isolate may give anticariogenic and probiotic effects on hosts.

Keywords: Dental caries, Kimchi, *Lactobacillus sakei*, Bacteriocin

1. 서론

충치 (dental caries, 치아우식증)는 치아의 파괴를 동반한 감염성 질환으로 치석 (plaque)내 미생물이, 음식물 타액의 상호작용에 의해 발생하는 다인성 질환이다. 미생물 중에서 *Streptococcus mutans*가 치석의 주요 원인균이며 [1,2], 이 미생물은 치면의 피막에 부착한 후 생성하는 glucosyltransferase (GTase)에 의하여 음식물 중의 sucrose로부터 불용성 glucan을 합성한다. 합성된 glucan은 치면에서 증식하는 미생물 간의 결합을 증가시키며, 치면에 부착한 *St. mutans*는 당질 대사과정에서 젖산 등의 유기산을 생성하여 치아의 에나멜질을 탈회 (decalcification)시켜 충치를 유발한다 [3].

최근에는 구강내에서 효과적인 항충치 작용을 가진 소재를 발굴하기 위해서 1) *St. mutans*의 증식을 저해하는 작용 [4,5] 2) sucrose로부터 glucan 형성에 관여하는 GTase 활성 저해 작용 [6,7], 3) *St. mutans*가 대사하지 못하는 sucrose 대체 감미료 사용 등 천연물질로부터 항충치 물질을 분리하고자 하는 연구가 시도되었다 [8].

김치는 우리 고유의 전통 발효식품으로 다양한 유산균이 생육하여 각종 암의 억제효과와 면역 증강효과 등의 영양학적 가치가 인정 되면서 김치에 대한 국제적 관심이 높아지고 있다 [9]. 이들 유산균은 장내 상피세포에 부착하여 항균성 박테리옌, 젖산 및 기타 유기산을 합성하여 병원균을 죽이거나 병원균에 의한 독소 생산을 억제하고, 독소 수용체를 분해하므로, 장내 유해 미생물에 항균 작용을 가진다 [10,11].

따라서 본 연구에서는 전통발효식품인 김치로부터 충치 유발균 중 대표적인 *St. mutans*에 대한 항균활성이 우수한 유산균을 분리 및 동정하고, 분리 유산균이 생성하는 박테리옌의 이화학적 특성을 조사하여 생균제 개발의 가능성을 검토하였다.

충북대학교 식품공학부
Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
Tel: +82-43-261-2567, Fax: +82-43-271-4412
e-mail: namsoo@cbnu.ac.kr

¹(주)에이피테크놀로지
¹Advanced Protein Technologies Corp., Suwon 443-813, Korea

²농촌진흥청 국립농업과학원
²National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 연구에 사용된 항충치 활성 균주는 가정용 및 시판용 김치로부터 분리하였다.

2.2. 사용 균주

항충치 활성의 측정에 사용된 감수성 균주는 한국미생물 자원센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받은 *St. mutans* KCTC3298 표준 균주를 사용하였다.

2.3. 항충치 활성 유산균의 분리

각종 김치시료 (10 g)을 파쇄 후 단계적으로 희석하여 MRS 고체배지에 도말 하였다. 37°C에서 24시간 배양하여 자란 colony에 5 mL BHI 액체 (calf brain 7.7 g, beef heart 9.8 g, proteose peptone 10 g, dextrose 2 g, sodium chloride 5 g, disodium chloride 2.5 g/L, pH 7.4, BD Co.), soft agar (0.7%, w/v)에 충치 유발 균주 (*St. mutans* KCTC3298, 1×10^6 CFU/mL)를 같이 혼합하여 고체배지 상에서 저해환 형성을 조사하였으며, 환을 생성한 유산균을 항충치 활성을 지닌 균주로 1차 선별하였다.

2.4. 항충치능 물질 제조

1차로 분리한 균주를 37°C에서 24시간 전배양한 후 50 mL Lactobacilli MRS broth 배지 (proteose peptone NO. 3, 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 5 g, dextrose 20 g, polysorbate80 1 g, ammonium citrate 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, manganese sulfate 0.05 g, dipotassium phosphate 2 g, sodium acetate 5 g/L, pH 6.5, BD Co.)에 1% 접종하여 30°C에서 18시간 배양하였다. 배양액을 원심 분리 (3,000 × g, 10 min, VISION) 하여 상등액을 회수하고, membrane filter (0.45 μm pore size)로 제균 하였고 제균한 상등액을 진공에서 원심분리기를 이용하여 농축하였다.

2.5. 박테리옌 활성 확인

분리 유산균들의 항충치 활성 박테리옌 생성 유무는 Paper disc diffusion assay 방법을 이용하여 판단하였다 [12,13]. 분리 균주의 항충치 활성을 측정하기 위해 MRS 고체 배지 위에 paper disc (8 mm)를 올려 놓은 후 조제한 조박테리옌 용액을 50 μL를 흡수시키고 감수성 균주인 *St. mutans* soft agar를 중층하였다. 이후 37°C 배양기에서 24시간 배양시킨 후 disc 주변 저해환의 크기로 항충치 활성을 측정하였다.

2.6. 항충치 활성 유산균 동정

항충치 활성 유산균의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 따라 형태학 및 생화학적 특성을 조사하였다 [14]. 최적 생육 온도, 그람 염색, 운동성, catalase test, CO₂ 생성 유무 및 API 50CHL kit (Biomerieux, Lyon, France)를 사용한 탄수화물 발효 양상을 조사 하였으며, 최종적으로 16S rRNA gene을 증폭하여 분리 유산균을 동정하였다. Genomic DNA는 Walter 등

의 방법 [15]에 따라 분리하였으며, 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 primers는 27F primer (AGAGTTTGATCM TGGCTCAG)와 1492R primer (TACGGYTACCTTGTTA CGACTT)를 사용하였고, PCR조건은 initial denaturation 5분, 그리고 94°C에서 45초간 denaturation, 55°C에서 60초간 annealing 및 72°C에서 60초간 extension의 cycle을 35회 실시하였다. 16S rRNA 염기서열 확인은 (주)Solgent사에 의뢰하여 확인하였다.

2.7. 항충치 물질의 이화화학적 특성 조사

각종 가수분해효소에 대한 영향: 각각의 buffer에 녹여 최종 농도 2 mg/mL로 맞춘 trypsin (13,500 U/mg, 50 Mm Tris-HCl, pH 7.5), lipase (12 U/mg, 20 Mm Tris-Hcl, pH 6.5) α-chymotrypsin (83.9 U/mg, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), α-amylase (519 U/mg, 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0), 그리고 proteinase K (30 U/mg, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.9, 0.005 M EDTA, 0.5% SDS)를 배양상등액과 37°C에서 3시간 반응시킨 다음 80°C에서 2분간 가열하여 효소를 불활성 화시켰다. 그리고, proteinase K는 45°C에서 12시간 반응 시켰다. 박테리옌 활성은 *St. mutans* KCTC 3298에 대한 저해환의 생성 유무로 확인하였다. 또한 동일한 조건에서 효소액만을 처리하지 않은 것을 대조구로 사용하였다.

열에 대한 안정성: 열에 대한 안정성의 조사는 제조된 박테리옌 용액을 40, 60, 80, 100 및 121°C에서 각각 30분 또는 60분간 열처리 한 후 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정하였다.

pH에 대한 안정성: pH에 대한 박테리옌의 안정성을 조사하기 위하여 부분 정제된 박테리옌을 10N NaOH와 10N HCl로 pH 2.0에서 11.0까지 조정한 후 상온에서 1시간 방치 후 항균활성을 측정하였다.

유기용매에 대한 안정성: 유기용매에 대한 안정성 실험은 chloroform, isopropanol, hexane, ethanol 및 acetonitrile 등을 제조된 박테리옌 용액과 같은 부피 비율로 혼합 (1 : 1)하여 상온 (25°C)에서 1시간 방치한 후, 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정함으로써 여러 유기용매에 대한 박테리옌의 안정성을 조사하였다.

2.8. 배양 시간에 따른 항충치물질의 생산

선별된 박테리옌 생산균주를 MRS broth에 접종하여 37°C에서 40시간 동안 배양하면서 일정 시간별로 배양액을 채취하여 OD 값을 측정 및 항균물질의 활성변화를 측정하였다. 항균 물질의 활성변화를 측정하기 위하여 배양액을 3,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 얻어진 상등액을 membrane filter (0.45 μm pore size)로 여과하여 cell-free supernatant를 조제한 다음 항충치 활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항충치 활성 유산균의 분리 및 동정

항충치 활성을 가진 유산균을 분리하기 위해서 김치 추출액

에 함유된 유산균을 충치 유발균주인 *St. mutans*와 종종배양 하였고 각 colony의 저해환의 크기를 측정하였다. 그 결과 저해 활성이 가장 우수한 유산균을 최종적으로 선발하였고 K-7으로 명명하고 본 실험에 사용하였다.

분리 유산균을 현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰한 결과 K-7은 그람 양성의 간균이었다. API kit (50CHL)를 이용하여 생화학적 특성을 비교한 결과, 공시균주인 *Lb. sakei* KCTC 3603과 가장 높은 동질성을 보였고 galactose, maltose, L-arabinose 대사능력에서 차이점을 보여 공시균주와 동일 속 또는 종에 속하는 신규균주로 판단되었다 (Table 1).

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of isolates K-7 from Kimchi

| Characteristics | Isolate K-7 | <i>Lactobacillus sakei</i> KCTC3603 |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Gram stain/Shape | + ^b /R ^a | +/R |
| Growth in aerobic/anaerobe | +/+ | +/+ |
| Carbohydrates | | |
| Sucrose | + | + |
| Galactose | - | + |
| Maltose | W ^c | + |
| L-Arabinose | - | + |

^a R, Rod.

^b Negative, -; positive, +.

^c W, Weak reaction.

또한 분리 유산균의 유전정보를 이용하여 동정하고자 16S rRNA 유전자를 증폭하고, 1530 bp 크기 염기서열을 해독한 결과 *Lb. sakei*와 98%의 유사성을 보여 위의 생화학적 분석과 동일한 결과를 나타내었다. 얻어진 결과를 바탕으로 분리 유산균을 *Lb. sakei* K-7으로 명명 하였으며, 16S rRNA database를 토대로 Phylogenetic tree를 작성하였고 (Fig 1), 본 균주의 유전정보는 Gene Bank database에 등록하였다 [AB650590].

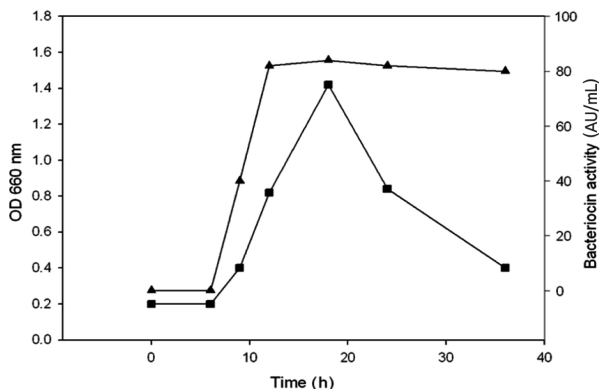


Fig. 1. Cell growth and bacteriocin production of *Lactobacillus sakei* K-7 in MRS broth. (▲) optical density 600nm (■) anticariogenic activities against *Streptococcus mutans*. (One arbitrary unit (AU) was defined as the reciprocal of the highest dilution showing a clear zone of growth inhibition of the indicator strain).

3.2. 생성 박테리오신의 이화학적 특성

분리 유산균인 *Lb. sakei* K-7이 생산하는 항충치 활성물질은

포함하는 용액에 각종 단백질 분해 효소를 2 mg/mL의 농도가 되도록 첨가하여 반응시킨 후 잔존활성을 측정한 결과, proteinase K, trypsin 및 chymotrypsin에 의해서 항균활성이 소실된 반면 α -amylase와 lipase의해서는 항균활성이 소실되지 않아 항충치 물질이 단백질인 박테리오신임을 알 수 있었다 (Table 2).

Table 2. Effect of various enzyme treatments on the bacteriocin activity of the supernatant partially purified from *Lactobacillus sakei* K-7

| Treatment | Residual bacteriocin activity |
|----------------------|-------------------------------|
| Control ^a | + ^b |
| α -Amylase | + |
| Proteinase K | - |
| Trypsin | - |
| Lipase | + |
| Chymotrypsin | - |

^a Non enzyme treated sample; *St. mutans* KCTC 3298 was used as an indicator.

Culture supernatant was mixed with enzyme solution at a final concentration of 2 mg/mL.

^b Degree of clear zone by growth inhibitor: + positive; - negative

본 연구에서 분리한 *Lb. sakei* K-7이 생산하는 박테리오신은 60-100°C에서 열 처리시에도 매우 안정하였다 (Table 3). pH에 대한 안정성 여부를 조사하기 위하여 배양 상층액을 부분 정제 후 용액에 완충용액을 가하여 pH를 조절한 뒤 잔존활성을 측정한 결과, 분리 균주가 생산하는 박테리오신은 pH 3.0-7.0에서 어떠한 활성의 소실없이 안정하였고 그 밖의 범위에서는 점차 활성이 감소하는 경향을 나타내었으나 그 활성이 완전하게 소실되지는 않았다.

또한, 유기용매에 대한 안정성의 경우 hexane, chloroform, acetone, acetonitrile, isopropanol, ethanol을 최종 농도 50% (v/v)로 처리할 경우 항균활성에 변화가 없는 것으로 보아 유기 용매에 매우 안정함을 확인 할 수 있었다 (Table 3).

Table 3. Effects of heat, pH, and organic solvents treatments on the activity of bacteriocin from *Lactobacillus sakei* K-7

| Treatment | Relative antimicrobial activity (%) | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----|
| Control | 100 | |
| Heat | 60°C 30, 60 min | 100 |
| | 80°C 30, 60 min | 100 |
| | 100°C 30, 60 min | 100 |
| | 121°C 15 min | 30 |
| pH ^a | 3 | 100 |
| | 5 | 100 |
| | 7 | 100 |
| | 9 | 50 |
| | 11 | 50 |
| Solvents ^a | Hexane, | 100 |
| | Chloroform, | 100 |
| | Acetonitrile, | 100 |
| | Isopropanol | 100 |
| | Ethanol | 100 |

^a Final concentration of solvent was 50% (v/v).

3.3 발효기간별 박테리오신 생산

Lb. sakei K-7 균주의 배양시간에 따른 성장곡선을 MRS 액체 배지에서 실험한 결과, 18시간째에 최대 OD 값이 1.5까지 성장하였다 (Fig. 2). 항충치 물질의 활성을 측정할 결과, 유도기부터 감수성균인 *St. mutans*에 대한 억제활성을 보이기 시작하였으며, 정체기에 80 AU/mL의 최대 항균활성을 나타내었다. 그리고 18시간 이후부터 급격하게 항균활성이 떨어졌다. 항균물질의 활성이 정체기를 지나 사멸기에 도달하면서 급격하게 저하되는 현상은 다른 일반 유산균이 생산하는 박테리오신의 배양특성과 매우 유사하였다 [16]. 항균활성이 급격하게 상실되는 이유로는 단백질 분해효소에 의한 박테리오신 물질의 분해, 단백질간의 응집, 그리고 박테리오신 생산 균주 세포에 대한 흡착 등으로 알려져 있다 [17].

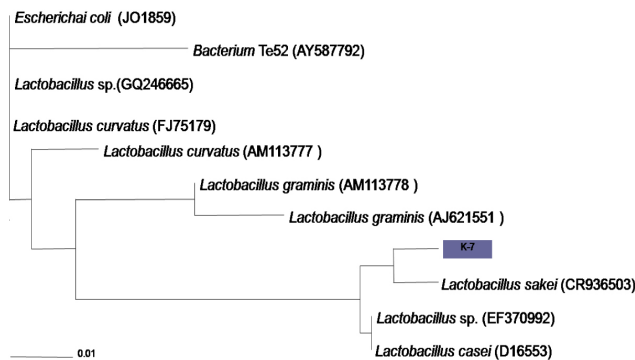


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the isolate, K-7 and related bacteria of the *Lactobacillus* group based on 16S rRNA gene sequence comparisons.

4. 결론

본 연구에서는 충치균인 *St. mutans*에 대한 항균활성이 우수한 유산균을 전통발효식품인 김치로부터 분리 및 동정하였고, 본 유산균이 생성하는 박테리오신의 이화학적 특성을 조사하여 생균제 개발의 가능성을 검토하였다. 분리된 활성유산균 중에서 가장 높은 항충치능을 갖는 유산균주 K-7을 최종적으로 선발하였다. API kit를 이용한 생화학적 분석 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 분리 균주를 동정한 결과 *Lb. sakei*로 확인되었고, *Lb. sakei* K-7으로 명명 하였으며, 이 균주의 유전정보는 Gene Bank에 등재하였다 [AB650590]. 배양시간에 따른 *Lb. sakei* K-7의 OD값 및 항충치 활성을 측정할 결과, 18시간 이후 최대 OD 1.5 값을 보였으며, 항충치 활성은 유도기에 나타나기 시작하여 정체기에 80 AU/mL로 최고값을 보이다가 이후 급격하게 활성을 상실하였다. 박테리오신으로 예측되는 항충치 물질은 60-100°C까지 활성을 유지하였으며, pH와 유기 용매에 대해서도 비교적 안정하였다.

감사

본 연구는 학술연구재단 협동 연구과제 (과제번호 F00051,

101012)의 지원과 농림부 15 어젠다 사업의 (PJ90715303) 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

References

- Hamada, S., T. Ooshima, M. Torii, H. Imanishi, N. Masuda, S. Sobue, and S. Kotani (1978) Induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese. *Children Microbiol. Immunol.* 22: 301-314.
- Mosci, F., S. Perito, S. Bass, and A. Capuano (1990) The role of *Streptococcus mutans* in human caries. *Minerva Stomatol.* 39: 413-429.
- Gibson, R. J. and J. Van Houte (1973) On the formation dental plaque. *J. Periodontol.* 44: 347-360.
- Jang, G. H., B. Y. Ahn, S. H. Oh, D. S. Choi, and Y. J. Kwon. (2000) Anticariogenic effects of coptis chinensis franch extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1396-1402.
- You, Y. S., K. M. Park, and Y. B. Kim (1993) Antimicrobial activity of some medicinal herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 187-191.
- Cho, Y. J. (2000) Isolation of 3-galloylprocyanidin B3, a glucosyltransferase inhibition from the Korean green tea leaves. *Agri. Chem. Biotechnol.* 43: 273-276.
- Nakahara, K., S. Kawabata, H. Ono, K. Ogura, T. Tanaka, T. Ooshima, and S. Hamada (1993) Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans streptococci. *Appl. Environmental Microbiol.* 4: 968-964.
- Ooshima, T., A. Izumitani, T. Minami, S. Yoshida, and S. Hamada (1992) Non cariogenicity of maltitol in specific pathogen-free rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.* 26: 33-37.
- Lee, M. K., K. K. Rhee, J. K. Kim, S. M. Kim, J. W. Jeong, and D. J. Jang (2007) A survey of research papers on Korean kimchi and R&D trends. *Kor. J. Food Culture* 22: 104-114.
- Aly, S., A. T. Cheik, H. N. Imael, and S. Alfred (2004) Antibacterial activities of lactic acid bacteria strain isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pak. J. Nutri.* 3: 174-179.
- Beak, S. S. and C. Ahn (1997) Antibiosis and bacteriocin production of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *J. Food Sci. Nutr.* 2: 109-120.
- Kim, D. S. (2002) Characteristics of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. Oh-B3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 184-188.
- Tagg, J. R. and A. R. McGiven (1971) Assay systems for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21: 943.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams (1994) Regular, Nonsporing Gram-positive Rods, pp. 565-570. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- Felske, A. and A. D. L. Akkermans (1998) Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microb. Ecol.* 36: 31-36.
- Aasen, I. M., T. Moretro, T. Katla, L. Axelsson, and L. Storro (2000) Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUF 42678. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53.
- Parente, E. and A. Ricciardi (1994) Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 1912-1915.